

München, 1960.

Über eine blutdrucksenkende
Substanz aus Hefe

von

HAGEN BUCHERT

Aus dem Laboratorium für klinische Chemie der
Chirurgischen Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Über eine blutdrucksenkende Substanz aus Hefe

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hagen Buchert
aus Berlin

M ü n c h e n

1 9 6 0

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Dr. W e r l e

Dekan: Prof. Dr. H. S c h w i e g k

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 4. 1960

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
a) Messung der Blutdruckaktivität der Hefesubstanz	2
2. Gewinnung und Anreicherung der Hefesubstanz	3
a) Freilegung der Substanz durch Autolyse	3
b) Abtrennung hochmolekularer Be- gleitstoffe durch Dialyse	4
c) Fällung der Substanz mit Aceton	5
d) Entfernung von Farbstoffen durch Tierkohleadsorption	5
e) weitere Reinigung an Ionenaus- tauschern	6
f) weitere Fraktionierung durch Papierchromatographie	9
3. Angaben über die spezifische Aktivität	10
4. Chemische und physikalische Eigenschaf- ten der blutdrucksenkenden Hefesubstanz	12
5. Inaktivierung der Substanz durch Blut- serum	13
6. Die Wirksamkeit der Substanz am Hundeblutdruck	14
7. Abgrenzung der Hefesubstanz von blut- drucksenkenden Substanzen mit bekann- ter Konstitution	16
a) Histamin	16
b) Cholin und Acetylcholin	17
c) Adenosinverbindungen	18

Zusammenfassung	Seite 19
Literaturverzeichnis	22
Lebenslauf	25



1. Einleitung.

E. Werle und W. Boden (1) veröffentlichten im Jahre 1940 eine Beobachtung über das Vorkommen einer vasopressorisch wirkenden Substanz in Hefe. Sie verwendeten für ihre Versuche Hefeautolysate, die sie Hunden intravenös injizierten und beobachteten, daß die blutdrucksteigernde Wirkung mit steigender Autolysatmenge nur bis zu einem gewissen Grade stieg. Injizierten sie größere Mengen, so folgte einer anfänglichen Blutdrucksteigerung eine deutliche Senkung. Man deutete dieses Phänomen zunächst als das Zusammenwirken von im Extrakt nebeneinander vorkommenden blutdrucksteigernden und -senkenden Substanzen.

Wir gingen von diesen Beobachtungen aus, in dem Bestreben, diese blutdrucksteigernden und -senkenden Komponenten voneinander zu trennen, sowie weitere Erfahrungen über ihre gegensätzliche physiologische Wirkungsweise zu sammeln. Man hatte damals beobachtet, daß die Trennung durch Dialyse nicht möglich ist. Die Blutdruckaktivität fand sich jeweils im Außendialysat. Es ist uns im Verlauf der vorliegenden Arbeit gelungen zu zeigen, daß es sich nach Abscheidung aller störenden Begleitstoffe bei dem anfänglich vasopressorischen und anschließend vasodepressorischen Effekt um die Wirkung einer

einheitlichen Substanz handelt, die sich in ihrer chemischen Natur, wie in ihren pharmakologischen Eigenschaften von allen bisher bekannten Hefestandteilen unterscheidet.

Als einheitliches Ausgangsmaterial zur Gewinnung der blutdruckaktiven Substanz für die Untersuchungen wurde frische Bäcker-Preßhefe der Firma Mayr, München verwendet; das Vorkommen der Substanz ist jedoch nicht an sie gebunden, sondern war in allen uns zugänglichen Hefesorten, z.B. Bierhefen der Firma Löwenbräu, München ebenfalls nachweisbar, lediglich in unterschiedlicher Konzentration.

a) Messung der Blutdruckaktivität der Hefesubstanz.

Die Aktivität der gelösten Hefesubstanz wurde geprüft an Hunden beiderlei Geschlechts und unterschiedlicher Rasse, die mit Morphinum und Pernocton narkotisiert wurden. Die Beatmung erfolgte künstlich mit Hilfe einer Atempumpe durch Trachealsonde mit Luft aus der Atmosphäre. Eine Art. carotis comm. wurde zur blutigen Druckmessung endständig mit einem geeichten Quecksilbermanometer verbunden, die Schreibung der Blutdruckkurve geschah nach der klassischen Methode von Karl Ludwig (1847) auf eine rotierende berußte Trommel. Appliziert wurden die Präparate durch Injektion in die V. saphena.

2. Gewinnung und Anreicherung der Hefesubstanz.

a) Freilegung der Substanz durch Autolyse.

Die blutdruckaktive Wirkung der Substanz ist nicht an die Struktur der Hefezelle gebunden. Wir autolysierten die Hefe zunächst nach einem Verfahren, das Willstätter und Bamann (2) angegeben haben:

500 g Hefe werden mit 1/10 ihres Gewichts Aethylinum acetic. versetzt und 10 min bei Zimmertemperatur belassen. Danach ist die Hefe völlig verflüssigt. Nun wird das ursprüngliche Hefegewicht Aqua dest. zugegeben und ein bis zwei Stunden lang weiter autolysiert. Die dabei freiwerdenden Säuren werden in kurzen Zeitabständen mit Ammoniak neutralisiert. Anschließendes Abzentrifugieren liefert in der überstehenden Lösung ein Vorautolysat. Den Niederschlag schwemmt man erneut mit dem ursprünglichen Hefegewicht Aqua dest. auf und beläßt ihn 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Erneutes Decantieren liefert ein Nachautolysat. Wir verarbeiteten es mit dem Vorautolysat gemeinsam weiter, da beide etwa zu gleichen Teilen die aktive Substanz enthielten.

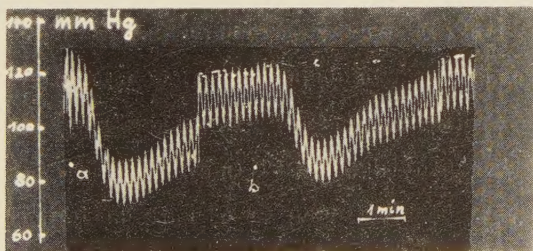


Abb. 1: Hund, männl., 14 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen.
a) 0,2 ml Hefevoraautolysat, entsprechend 0,1g

Frischhefe, b) 0,2 ml Hefenachautolysat,
entsprechend 0,07g Frischhefe.

b) Abtrennung hochmolekularer Begleitstoffe durch
Dialyse.

Die gesuchte Substanz erwies sich nunmehr als niedermolekular, da nach 24 stündiger Dialyse gegen fließendes Wasser keine Blutdruckaktivität mehr nachweisbar war. Um eine weitere Reinigung des Präparates zu erreichen, dialysierten wir infolgedessen unter ständigem Rühren gegen insgesamt 7,5 l Aqua dest. Nach 24 Stunden war das Innendialysat nur noch schwach wirksam, die Substanz hatte größtenteils die Dialysierfolie passiert. (Es empfiehlt sich, vor der Dialyse den zum Autolysieren verwendeten Essigester abzudestillieren, da er die Dialysierfolie angreift.)

Wegen des großen Volumens engten wir das erhaltene Außendialysat auf 1/50 seines Volumens im Vakuum ein. Dies geschah verlustlos; ein Überdestillieren der Substanz konnte ausgeschlossen werden, im Destillat war keine Aktivität nachweisbar. Es ist auch nicht erforderlich, das Einengen in einer Atmosphäre reinen Stickstoffs vorzunehmen. Dies ergab keine Vergrößerung der Ausbeute. Die Substanz ist also in diesem Reinheitsgrad nicht sauerstoffempfindlich.

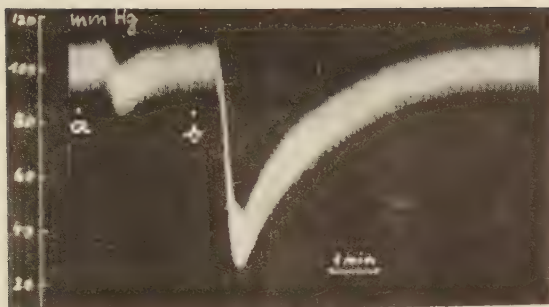


Abb. 2: Hund, weibl., 12 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen.
a) 0,8 ml eines nach 26 stündiger Dialyse gewonnenen Außendialysats, b) 0,1 ml desselben Präparats, im Vakuum auf 1/50 des ursprünglichen Volumens eingengt.

c) Fällung der Substanz mit Aceton.

Versuche, die Substanz mit Äthanol, Methanol oder Aceton quantitativ zur Ausfällung zu bringen, schlugen fehl. Die Fällung mit dem 12-fachen Acetonüberschuß ergab aber im Niederschlag eine starke Anreicherung der aktiven Substanz, von der wir wegen der Volumenverminderung Gebrauch machten, doch war die Fällung nicht quantitativ, da in der überstehenden Lösung noch etwa 30 % der Gesamtaktivität enthalten waren. Eine weitgehende Eliminierung von Begleitsubstanzen aus dem Gemisch war papierchromatographisch nicht erkennbar.

d) Entfernung von Farbstoffen durch Tierkohleabsorption.

An dieser Stelle des Reinigungsweges setzten

wir dem Präparat Aktivkohle zu. Dadurch wurde die blutdrucksenkende Wirkung der überstehenden Lösung im Tierversuch nicht meßbar vermindert. Die bisher klar-bernsteingelbe Lösung wurde farblos. Die Abnahme des Trockengewichts durch diesen Reinigungsschritt betrug 20 % des Trockengewichts der Außendialysate. Nachfolgende Elution des Kohlerückstandes lieferte keine kreislaufaktiven Substanzen mehr.

e) Weitere Reinigung an Ionenaustauschern.

Wir fraktionierten das so vorbehandelte Präparat an Ionenaustauschern. Für diese Arbeiten wurden Chromatographiersäulen der Dimension 6,75 qcm Grundfläche und 50 cm Höhe verwendet. Sie wurden folgendermaßen beschickt:

Zunächst wuschen wir Amberlite IR4B mehrfach mit destilliertem Wasser, anschließend wurde er mit 0,1 n Natronlauge versetzt und darin unter ständigem Rühren 15 min belassen. Weitere 15 min wurde er nach dem Dekantieren der Lauge mit 0,1 n Salzsäure behandelt, danach wieder mit 0,1 n Natronlauge und so im Wechsel, bis vollständige Regenerierung in Rohform erreicht war, was sich darin zeigte, daß keine Teilchen des gemahlenden Kunstharzes mehr an der Oberfläche schwammen. Zum Schluß wurde der Amberlite IR4B mit 0,1 n Natronlauge versetzt und in die Säule gefüllt, wo er sich ohne die Anwendung von Druck selbständig und locker sedimentierte. Die Säule wurde nun so lange mit Aqua dest gespült, bis im Auslauf neu-

trale Reaktion auftrat. Jetzt konnte die Säule mit dem zu fraktionierenden Substanzgemisch beschickt werden, wobei wir vermieden, daß die Austauschkapazität des Amberlite überstiegen wurde. Unsere Säulen wurden mit 20 ccm der Lösung des Präparates beschickt. Der Durchlauf - er wurde in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen - mußte jeweils vor der Applikation am Versuchstier neutralisiert werden. Daß ein Ionenaustausch stattfand wurde daran erkannt, daß der Durchlauf sauer wurde. Die ersten vier Fraktionen waren blutdruckaktiv, besonders die zweite und dritte.

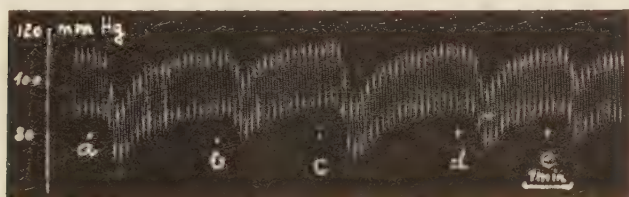


Abb. 3: Hund, männl., 16 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen. Fraktionierung an Amberlite IR4B. a) 0,3 ml eingengtes Hefeaußendialysat. b) 1,0 ml Fraktion I, c) 0,3 ml Fraktion II, d) 0,3 ml Fraktion III, e) 0,5 ml Fraktion IV.

Diese Fraktionen wurden gemeinsam weiter verarbeitet, da sich zeigte, daß in den Fraktionen noch erhebliche Mengen von Begleitsubstanzen vorhanden waren, was wir papierchromatographisch nachwiesen. Es gelang also nicht, die gesuchte Substanz an den Amberlite zu adsorbieren, um sie anschließend mit einem geeigneten Elutionsmittel wieder zu gewinnen, oder sie von Verunreinigungen befreit, direkt zu gewinnen.

Analoge Ergebnisse erhielten wir bei der Fraktionierung an Amberlite IR4B-C1, IRC50 und XE64, die die gegensinnigen Ionen austauschen.

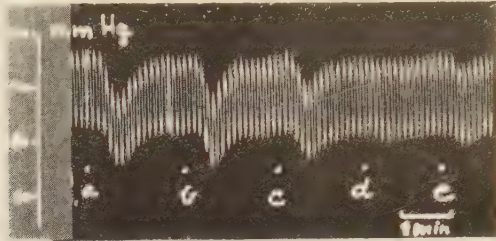


Abb. 4: Hund, männl., 16 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen. Fraktionierung an Amberlite IR4B-C1. a) 0,3 ml eingeengtes Hefeaußendialysat, b) 1,0 ml Fraktion I, c) 0,3 ml Fraktion II, d) 0,3 ml Fraktion III, e) 1,0 ml Fraktion IV.

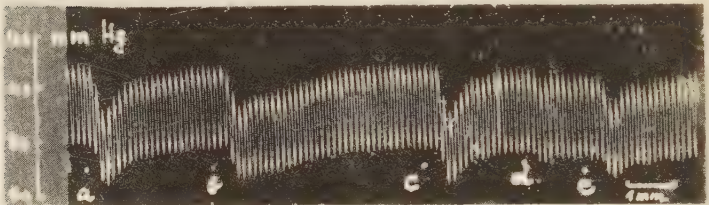


Abb. 5: Hund, männl., 16 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen. Fraktionierung an Amberlite IRC50. a) 0,3 ml eingeengtes Hefeaußendialysat, b) 0,5 ml Fraktion I, c) 0,5 ml Fraktion II, d) 1,0 ml Fraktion III, e) 2,0 ml Fraktion IV.

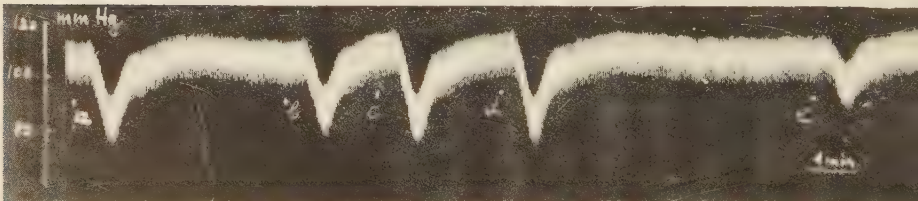


Abb. 6: Hund, weibl., 14 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen. Fraktionierung an Amberlite XE64. a) 0,3 ml

eingeeengtes Hefeaußendialysat. b) 0,3 ml
Fraktion I, c) 0,5 ml Fraktion II, d) 0,6 ml
Fraktion III, e) 2,0 ml Fraktion IV.

Die Ionenaustauscher wurden in der beschriebenen Weise in der Rohform regeneriert, jedoch abschließend mit 1/10 n Salzsäure versetzt und in die Säulen gefüllt. Immer waren die ersten vier Fraktionen am Hund blutdruckaktiv, ohne daß die Substanz in ihrer Reinform vorgelegen hätte. Anschließende Elution der Ionenaustauscher erbrachte keine blutdruckaktiven Substanzen mehr. Die Zahl der Begleitsubstanzen hatte sich nach diesen Passagen des Gemisches signifikant vermindert, was wir wiederum chromatographisch zeigen konnten. Wir schlossen daraus, daß die gesuchte Substanz als elektrisch ungeladenes Molekül im Hefeautolysat vorliegt.

f) weitere Fraktionierung durch Papierchromatographie.

Im Anschluß an die Reinigung an Austauschersäulen wurde versucht, die Substanz papierchromatographisch weiter zu reinigen. Es wurde auf Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2040 a und mit Butanol/Eisessig/Wasser als Entwicklerflüssigkeit im Verhältnis 80/20/20 chromatographiert, und zwar 36 Stunden lang. Zu diesem Zweck wurden Substanzmengen von 5 ml mit einem Trockengewicht von 2,2330 mg auf einer Strecke von 50 cm aufgetragen. Die gesuchte Substanz befand sich innerhalb einer mit Ninhydrin einheitlich violett färbbaren Zone. Der Rf-Wert beträgt 0,46 . Zur Ninhydrinfärbung

wurde nur ein schmaler Randstreifen verwendet, aus der Hauptfläche des Papiers wurde die aktive Substanz mit Aqua dest. eluiert, nachdem die Papierbögen in Höhe der gefärbten Streifen quer durchschnitten und zerkleinert worden waren.

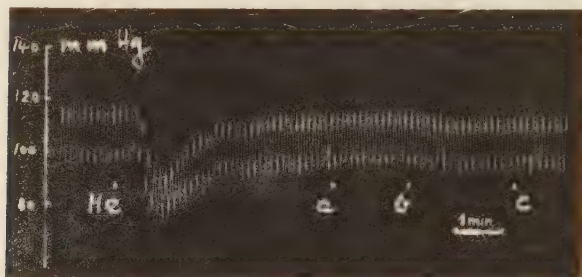


Abb. 7: Hund, männl., 14,5 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen. Die Blutdruckaktivität erscheint in ihrer Gesamtheit im Bereich eines eluierten Chromatogrammsstreifens, die benachbarten Streifen a), b), c) besitzen keine Blutdruckwirkung.

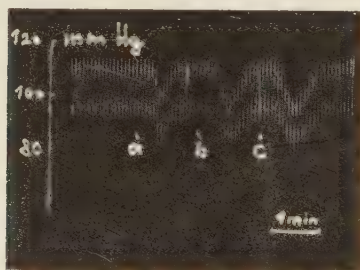


Abb. 8: Hund, männl., 14,5 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektion. a) 7 Gamma Histamin, b) 0,3 KE, c) 0,248 mg Hefesubstanz.

3. Angaben über die spezifische Aktivität.

Wir gingen aus von jeweils 500 g frischer Bäckerpresshefe. Es wurden drei Trockengewichtsbestim-

mungen der Reinsubstanz durchgeführt, im Vergleich zum Trockengewicht des im Volumen eingeengten Außendialysats nach der Adsorption von Begleitsubstanzen an Aktivkohle. Die Werte waren:

Trockengewicht nach Kohleadsorption: Reinsubstanz:

I)	0,3547 g	0,07443 g
II)	0,3547 g	0,07447 g
III)	0,3546 g	0,07439 g

Es beträgt also die Ausbeute an blutdruckaktiver Substanz aus 500 g Hefe bei unserer Art der Darstellung etwa 1,785 g. Das Präparat wurde in seiner Wirkung mit der von Histamin und von standardisierten Kallikreinpräparaten verglichen. 0,248 mg, entsprechend rund 70 mg Frischhefe, lösten eine Blutdrucksenkung aus, die der Aktivität von 3-7 Gamma Histamin, bzw. 0,3 KE entspricht. Die Anreicherung der Substanz ist etwa 200-fach.



Abb.9: Die chromatographisch einheitliche Substanz.

4. Chemische und physikalische Eigenschaften der blutdrucksenkenden Hefesubstanz.

Die Substanz erwies sich zunächst einmal als außerordentlich hitzebeständig. Das Eindampfen auf dem Wasserbad bis zur Trockne und Wiederauflösen in destilliertem Wasser führte zu keiner meßbaren Verminderung der Aktivität.

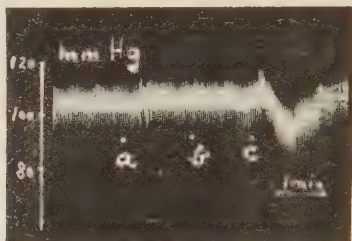


Abb. 10: Hund, männl., 10 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen.
a) die verkohlte Substanz, b) die Substanz nach dem Verglühen, c) zur Trockne eingedampft und wieder aufgelöst. Je 0,3 ml.

Durch Verkohlen wurde die Aktivität zerstört, sie war auch in der Asche nicht mehr nachweisbar. Deswegen entfällt eine Verfälschung unserer Versuchsergebnisse durch anorganische Ionen.

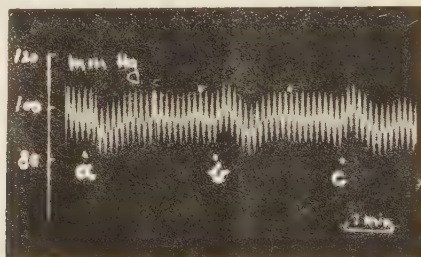


Abb. 11: Hund, männl., 12 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen.
a) 0,5 KE, b) 0,5 ml chromatographisch einheitlicher Hefesubstanz, c) 0,5 ml derselben Substanz nach 30 min langem Erhitzen auf 100°C

Gegen Alkali, Säuren und andere Reagentien (z.B. oxydierende Mittel, Nitrite) war die Substanz gleichermaßen beständig. Halbstündiges Kochen mit 1 n Natronlauge und in Salzsäure führten zu keinem Aktivitätsverlust.

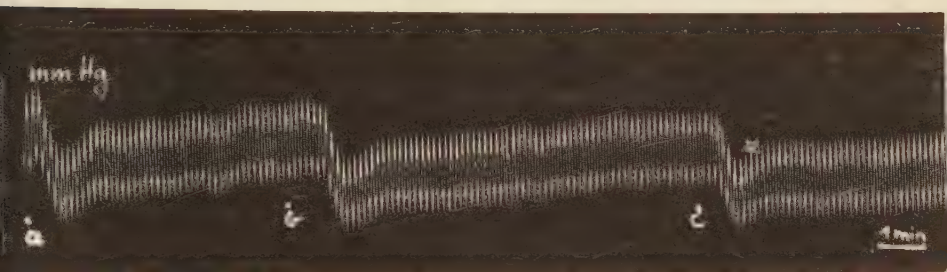


Abb. 12: Hund, männl., 16 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, künstl. beatmet, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektionen.

a) 0,5 ml chromatographisch einheitlicher Hefesubstanz, b) nach 30 min langem Kochen mit 1n HCl, c) nach 30 min langem Kochen mit 1n NaOH.

Es bildete sich in beiden Fällen ein Niederschlag, der sich bei der anschließenden Neutralisation in der Kälte wieder löste. Er, wie auch die überstehende Lösung enthielten die Aktivität. Ebenso negativ verlief der Versuch, die Substanz mit Bleiacetat quantitativ zu fällen.

In Chloroform ist die Substanz nicht löslich, desgleichen kann man sie aus dem Gemisch nicht mit Äther extrahieren.

5. Inaktivierung der Substanz durch Blutserum.

Nach 30 min langer Inkubation im Brutschrank bei 37°C mit Rinderplasma war die Aktivität des Außendialysats weitgehend geschwunden. Das Rinderplasma selbst

war vor und nach der Inkubation nicht blutdruckwirksam. Wir schlossen daraus, daß die Substanz abgebaut oder zumindest in ihrer wirksamen Gruppe verändert worden war. Inkubierten wir längere Zeit, nämlich 24 Stunden, so war eine Aktivität im Sinne einer Blutdrucksenkung wiederum nachweisbar. Das entstandene Produkt erwies sich auch am Meerschweinchenileum als aktiv, obwohl beide Substanzen getrennt, das Plasma, wie das Substanzgemisch am Meerschweinchenileum inaktiv waren. Wurde die Inkubation mit Zusatz von Terramycin vorgenommen, so zeigte sich nach 24 Stunden weder eine Aktivität am Hundeblutdruck, noch wurde das isolierte Meerschweinchenileum kontrahiert. Es dürfte sich somit um die Bildung aktiver Substanz durch Bakterienwachstum gehandelt haben. Da die neu-entstandene Aktivität durch Zusatz von Antistin zur Suspensionsflüssigkeit des isolierten Meerschweinchenileums unterdrückt wurde, dürfte es sich um Histamin gehandelt haben.

6. Die Wirksamkeit der Substanz am Hundeblutdruck.

Die Blutdruckaktivität des Hefeautolysats, wie auch der chromatographisch einheitlichen Substanz trat jeweils spontan nach der intravenösen Injektion auf. Bei steigender Dosierung beobachteten wir, sofern überhaupt überschwellige Dosen appliziert wurden, zunächst eine Blutdrucksteigerung und einen ebenso schnellen Abfall zur Norm. Mit steigenden Mengen folgte einer in ihrer Höhe stets konstanten Blutdrucksteigerung eine Senkung, die in ihrer Größe zunächst

von der Substanzmenge abhängig war. Wenn wir nun das Außendialysat im Volumen einengten und dann größere Substanzmengen injizierten, so zeigte es sich, daß die Blutdrucksenkung im vertikalen Sinne nicht entsprechend zunahm, sondern daß die Substanz eine verstärkte Wirkung in horizontaler Richtung entfaltete, das heißt, es wurde nicht die Blutdrucksenkung verstärkt, sondern ihre Dauer verlängert. Gleiche Mengen an wirksamer Substanz waren vor und nach dem Einengungsvorgang gleich stark wirksam. Ein Überdestillieren konnte ausgeschlossen werden, das Destillat erwies sich als nicht blutdruckaktiv, das heißt, die Substanz ist nicht flüchtig. Wir schlossen daraus, daß dieser Effekt in der Substanz selbst begründet sein müsse. Wir konnten ihn am nicht eingengten Dialysat, bzw. an der papierchromatographisch gewonnenen Reinsubstanz wegen der dazu notwendigen Mengen nicht ausgiebig genug prüfen, andeutungsweise zeigte sich dieses Verhalten aber auch hier.

Die Substanz wirkt offenbar rein peripher und nicht zentral, da sie nach Atropinisieren des Versuchstieres unverändert aktiv ist.

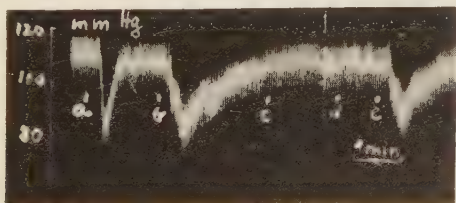


Abb. 13: Hund, männl., 10 kg, Morphinum-Pernocton-Narkose, Carotisblutdruck am Ludwigschen Quecksilbermanometer, intravenöse Injektion.
a) 0,1 ml Cholin, b) 0,6 ml Hefesubstanz,

c) 1,0 ml Atropin, d) 0,1 ml Cholin, e)
0,6 ml Hefesubstanz.

Ob die initiale Blutdrucksteigerung auf einer Reizung des Sympathikus oder der Nebennieren beruht, könnte anhand der sogenannten Adrenalinumkehr an mit Ergotoxin vorbehandelten Versuchstieren geprüft werden. Eine Verunreinigung der Substanz mit Tyramin oder 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) ist unwahrscheinlich, da beide Substanzen am isolierten Meerschweinchenileum eine Kontraktion auslösen.

7. Abgrenzung der Hefesubstanz von blutdrucksenkenden Substanzen mit bekannter Konstitution.

a) Histamin.

Die Hitzebeständigkeit des Histamins hängt vom p_H ab. Wird ein histaminhaltiger Gewebsextrakt alkalisch gemacht, so tritt zumindest ein erheblicher Verlust an Histamin ein.

Histamin wird sehr leicht an Tierkohle adsorbiert. (3)

Histamin wird in schwach saurer Lösung durch Nitrite zerstört. (4;5)

Am isolierten Arterienstreifen, beispielsweise der Meerschweinenaorta wirkt Histamin kontrahierend. (6) Ebenso wirkt es auf das isolierte Meerschweinchenileum; (7;8) der kontrahierende Effekt auf das Uterushorn des virginellen Meerschweinchens war eine der ersten pharmakologischen Eigenschaften des Histamins, die entdeckt wurden. (6)

Unsere Substanz ist beständig gegen 30 min lan-

ges Kochen in alkalischem Milieu, ein Aktivitätsverlust war nicht meßbar. Wir benutzten die Adsorptionsfähigkeit von Begleitsubstanzen an Tierkohle zur Reinigung der Autolysate, es trat dabei kein Aktivitätsverlust am Hundenblutdruck auf, es war uns auch nicht möglich, eine blutdruckaktive Substanz aus der Kohle wiederum zu eluieren. Unsere Substanz wird durch Nitrite nicht beeinflußt. Sie war sowohl am isolierten Aortenstreifen, wie am Ileum und am Uterus des Meerschweinchens inaktiv.

b) Cholin und Acetylcholin.

Acetylcholin wird bereits bei Zimmertemperatur innerhalb von 10 min bei Anwesenheit eines gleichen Volumens m-Natronlauge zerstört. (9; 10)

Acetylcholin wird leicht an Tierkohle adsorbiert, allerdings nicht so vollständig wie Histamin. (3; 11; 12)

Die Wirkung des Cholins wie des Acetylcholins, die sich durch die Anwesenheit der Acetylgruppe lediglich quantitativ, nicht aber in der allgemeinen Natur der Wirkung unterscheiden, wird durch Atropin, und zwar schon in kleinen Dosen aufgehoben. (13)

Acetylcholin erhöht schon in kleinsten Dosen den Tonus der Ring- und Längsmuskulatur des isolierten Meerschweinchenileums, und zwar in der Konzentration 1:100 Millionen, (14) während die Hefesubstanz, wie bereits erwähnt, am Meerschweinchendarm unwirksam ist.

Unsere Substanz hat sich gegen das Kochen mit Natronlauge, 30 min lang als stabil erwiesen. An Koh-

le ist sie, wie schon erwähnt, nicht adsorbierbar. Wenn wir Acetylcholin und unsere Substanz am Carotishund testeten, erwiesen sich beide Substanzen als blutdrucksenkend. Wenn wir sie am atropinisierten Hund testeten, war Acetylcholin nicht mehr wirksam, unsere Substanz war noch aktiv und zwar ungeschwächt.

c) Adenosinverbindungen.

Daß sich in der Hefe eine blutdruckaktive Substanz findet, die Hefenukleinsäure, ist lange bekannt. (15) Die Vermutung, daß unsere Substanz mit ihr identisch sei, lag nahe, hat sich aber nicht bestätigt. Adenosin ist in saurer Lösung wenig stabil. Es wird durch 5 min langes Kochen mit Salzsäure in Adenin und Pentose hydrolysiert, wodurch es seine Wirkung einbüßt. (16) Adenosinverbindungen sind die einzig bekannten Stoffe, die beim atropinisierten Versuchstier eine Blutdrucksenkung bewirken und ein 10 min langes Kochen mit Natronlauge überstehen. (17) Es ist ferner bekannt, daß der Blindsack des Hühnerdarms ein empfindliches Reagens für Adenosin darstellt. (18) Die Adenosinverbindungen geben mit Bial's Reagens die Orcinreaktion.

Unsere Substanz ist nun gegen das Kochen mit Säure und Lauge stabil und wirkt auch am atropinisierten Versuchstier. Das gereinigte Präparat war am Blindsack des Hühnerdarms nicht aktiv, wohl aber das ungereinigte Hefeautolysat. Die Bial'sche Reaktion war am Hefeautolysat positiv, am chromatographisch

einheitlichen Präparat nicht mehr.

Zur Aufklärung der Chemie der Substanz sind weitere Untersuchungen notwendig. Sie können durchgeführt werden, wenn das mit Hilfe des geschilderten Reinigungsverfahrens in größeren Mengen gewonnene einheitliche Präparat zur Verfügung steht.

Zusammenfassung.

Es wird über eine blutdruckaktive Substanz berichtet, die sich in der Hefe nachweisen läßt. Die Substanz senkt bei i.v. Injektion den Blutdruck des narkotisierten Versuchshundes nach anfänglicher geringer Steigerung. Sie unterscheidet sich in ihren Eigenschaften von sämtlichen bisher bekannten blutdruckaktiven Substanzen.

Die Darstellung der Substanz erfolgte aus autolyserter Bäckerhefe. Ihre blutdruckaktive Wirkung ist nicht an die Zellstruktur gebunden, d.h. die Substanz geht bei der Autolyse der Hefe in Lösung. Sie ist dialysierbar, also niedermolekular und kann so von allen hochmolekularen Substanzen des Hefeautolysats abgetrennt werden. Durch Tierkohle und Ionenaustauscher wird die Substanz nicht aufgenommen. Daraus ergab sich die Möglichkeit, niedermolekulare Substanzen aus den Lösungen der Wirksubstanz weitgehend zu entfernen. Nach aufsteigender Papierchromatographie in Butanol/Eisessig/Wasser war die aktive Substanz in einer mit Ninhydrin anfärbbaren Zone nachweisbar.

Nach streifenförmiger Auftragung der Lösung der gereinigten Substanz und Quereluierung der die aktive Substanz enthaltenden Zone und Rechromatographie derselben ergab sich nur noch eine einzige gefärbte Zone. Ob die ninhydrinfärbbare Substanz mit der aktiven gekoppelt ist oder sie nur hartnäckig begleitet, ist noch nicht entschieden.

Die Substanz ist widerstandsfähig gegen halbstündiges Kochen in saurem und alkalischem Milieu. Das Eindampfen auf dem Wasserbad bis zur Trockne und anschließende Wiederauflösen schwächt ihre Aktivität nicht. Durch Verkohlen und Verglühen wird sie zerstört, es handelt sich also um eine organische Substanz. Die Blutdruckaktivität war nach halbstündiger Inkubation mit Rinderserum nicht mehr nachweisbar. Das bedeutet, daß die Substanz - möglicherweise fermentativ - von Rinderserum inaktiviert wird. Salpetrige Säure als oxydierendes Mittel verursachte keine Abschwächung der Blutdruckaktivität.

Die Aktivität der Substanz wurde mit der von Histamin und Kallikrein verglichen. Es zeigte sich, daß 1,0 mg der Substanz in ihrer blutdrucksenkenden Wirkung 12-28 Gamma Histamin oder 1,2 KE entspricht.

Die Wirkung der Substanz auf den Hundeblutdruck ist offenbar eine rein periphere, da sie durch Atropinisieren des Versuchstieres nicht verringert wird. Der Blutdrucksenkung durch das Präparat geht eine kurze vasopressorische Wirkung voraus. Welcher Art diese ist, bedarf noch der Klärung. Wir beobachteten, daß sie in

ihrer Stärke nicht von der applizierten Substanzmenge abhängig ist. Sie könnte auf einer Reizung des Sympathikus oder der Nebenniere beruhen.

Die Substanz läßt sich gegen Histamin **abgrenzen**. Im Gegensatz zu Histamin wird die Substanz durch Nitrit nicht zerstört, auch ist sie am isolierten Kaniinchenaortenstreifen, am isolierten Meerschweinchenuterus und Ileum nicht wirksam. Sie unterscheidet sich von Cholin und Acetylcholin durch ihre schon erwähnte Kochfestigkeit in alkalischem Milieu, besonders aber dadurch, daß ihre Wirkung durch Atropin nicht beeinflußt wird.

Bei der Hefesubstanz handelt es sich auch nicht um eine adenosinartige Substanz. Adenosin wird nämlich durch Kochen in Salzsäure hydrolytisch gespalten und dadurch blutdruckinaktiv - im Gegensatz zur Hefesubstanz. Der Blindsack des Hühnerdarms wird durch Adenosin erschlafft, von der Hefesubstanz aber nicht beeinflußt. Die Hefesubstanz gibt keine Reaktion mit Bial's Reagens im Gegensatz zu Adenosin.

Schrifttum

1. Werle, E. und W. Boden, Zur Frage des Vorkommens von Aminosäurendecarboxylasen, sowie der Histaminase, Tyramin- und Tryptaminoxidase in pflanzlichem Material, sowie über eine blutdrucksteigernde Substanz aus Hefe. Biochemische Zeitschrift 304, S. 371 (1940)
2. E. Bamann und R. Willstätter, Die Methoden der Fermentforschung Bd. 2, S. 1175 Leipzig (1941)
3. Saunders, F. Lackner, F.E. und S.S. Schochet, Studies in adsorption, J. Pharmacol. 42 S. 169 (1931)
4. Felix, A. und A.v.Putzer-Reyboegg, Physiologisch-chemische Analyse der blutdrucksenkenden Wirkung von Organextrakten, Arch. f. exper. Path. und Pharmacol. 164 S. 402 (1932)
5. Gaddum, J.H. und H. Schild, Depressor Substances in tissue extracts, J. Physiol. 83 S.1 (1934)
6. Dale, H.H. und P.P. Laidlaw, The physiological action of β -iminazolyethylamine, J. Physiol. 41 S.318 (1910)
7. Guggenheim, M. und W. Löffler, Biologischer Nachweis proteinogener Amine in Organextrakten und Körperflüssigkeiten, Biochem. Ztschr. 72 S.303 (1916)
8. Kendall, A.I., und F.C. Shumate, The quantitative response of intestine from sensitised guinea-pigs to homologous protein and to histamine, J.Infect. Dis. 47 S. 276 (1930)
9. Dale, H.H. und H.W. Dudley, The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the Ox and the Horse, J. Physiol. 68 S. 97 (1929)
10. Velhagen, K.jr., Alkaliempfindlichkeit als Unterscheidungsmerkmal von Cholin und Acetylcholin, Arch.f.exper.Path. u. Pharmacol. 161 S.697 (1931)
11. Galehr, O. und F. Plattner, Über das Schicksal des Acetylcholins im Blute, Arch.f.d.ges.Physiol. 218, S. 488 (1928)
12. Engelhart, E. und O.Loewi, Fermentative Azetylcholin-spaltung im Blut und ihre Hemmung durch Physostigmin, Arch.f.exper.Path. und Pharmacol. 150 S. 1 (1930)

13. Kögl, F., Duisberg, H. und H.Erxleben, Über das Muskarin. Liebigs Annalen, 489 S. 156 (1931)
14. Dale, H.H., The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine, J.Pharmacol. 6 S. 147 (1914)
15. Levene, P.A., und L.W.Bass, Nucleic Acids, New York (1931)
16. Lohmann, K., Darstellung der Adenylpyrophosphorsäure aus Muskulatur, Biochem.Ztschr. 233 S.460
17. Gaddum, J.H., Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe, Leipzig (1936)
18. Barsoum, G.S. und J.H. Gaddum, The pharmacological estimation of histamine and adenosine in blood, J.Physiol. 85 S.1 (1935)

Herrn Prof. Dr. Eugen W e r l e , dem Leiter des
Labors für klinische Chemie der Chirurgischen Univer-
sitätsklinik, möchte ich für die Überlassung des
Themas der vorliegenden Arbeit ergebenst danken, besonders
aber für seine grosszügige und wohlwollende Unterstützung.

Lebenslauf.

Ich, Hagen Buchert, wurde am 16.2.1932 als ältester Sohn des Dr. rer. pol. Gerhart Buchert und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Küter, in Berlin geboren. Nach Absolvierung von vier Jahren Volksschule besuchte ich das humanistische Gymnasium und bestand am 24.4.1953 das ausserordentliche Abitur der Freien Waldorfschule zu Stuttgart. Im Mai 1953 begann ich in München das Studium der Medizin und habe nach elf Semestern im Dezember 1958 das Staatsexamen dortselbst abgelegt. Zunächst war ich als Medizinalassistent in der II. Medizinischen Universitätsklinik tätig, jetzt im Kreiskrankenhaus Tirschenreuth/OPf.

